PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/43442
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. November 1997 (20.11.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Mai 1997 ((30) Prioritätsdaten: 196 19 362.1 14. Mai 1996 (14.05.96) (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): B TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludv (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIFFERT, [DE/DE]; Schönleinstrasse 49, D-45147 Essen (DI (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLS D-67056 Ludwigshafen (DE).	I ASF A wigshaf Winfri E).	IL, JP, KR, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.
(54) Title: USE OF A MUTATION IN THE GENE FOR	ним	AN G-PROTEIN β3 SUB-UNIT FOR DIAGNOSING ILLNESSES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINER GENVERÄNDERUNG IM GEN FÜR DIE HUMANE G-PROTEIN β 3-UNTEREINHEIT ZUR DIAGNOSTIK VON ERKRANKUNGEN

(57) Abstract

The present invention relates to the use of a mutation in the gene for human G-protein β 3 sub-unit for diagnosing illnesses.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein β 3-Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL AM AT AU AZ BA BB BE BE BF BG BJ BR	Albanien Armenien Osterreich Australien Aserbaidschan Bosnien-Herzegowina Barbados Belgien Burkina Paso Bulgarien Benin Benin Brasilien	ES FI FR GA GB GE GH GN GR HU IB	Spanien Finnland Frankreich Gabus Vereinigtes Königreich Georgien Ghana Guinea Griechenland Ungarn Irland Israel	LS LT LU LV MC MD MG MK ML MN MR	Lesotho Litauen Lutenburg Lettland Monaco Republik Moldau Madagaskar Die chemalige jugoslawische Republik Mazedonien Mali Mongolei Mauretanien	SI SK SN SZ TD TG TJ TM TR TI UA UG US	Slowenien Slowakei Senegal Swasiland Tuchad Togo Tadachikistan Turkmenistan Turkei Trinidad und Tobago Ukraine Uganda Vereinigte Staaten von	
BY CA CF CG CH CI CM CN CU CZ DE	Brasilien Belarus Kanada Zentralafrikanische Republik Kongo Schweiz Côte d'Ivoire Kamerun China Kuba Tachechische Republik Deutschland Dinemark	IL IS IT JP KE KG KP KR LC LL LK	Israel Island Italien Japan Kenia Kingisistan Demokratische Volksrepublik Korea Republik Korea Kasachstan St. Lucia Lischenstein Srl Lanka	MW MX NE NL NO NZ PL PT RO RU SD SE	Malawi Mexiko Niger Niederlande Norwegen Neuseeland Polen Portugal Rumänien Russische Föderation Sudan Schweden			
ER DK DE								

WO 97/43442 PCT/EP97/02250

VERWENDUNG EINER GENVERÄNDERUNG IM GEN FÜR DIE HUMANE G-PROTEIN $\beta 3$ -UNTEREINHEIT ZUR DIAGNOSTIK VON ERKRANKUNGEN

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostik von Erkrankungen mittels Genanalyse, insbesondere der Analyse von Genen für Untereinheiten der humanen Guaninnukleotid-bindenden 10 Proteine (G-Proteine).

Heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) haben eine herausragende Bedeutung bei der intrazellulären Signaltransduktion. Sie vermitteln die Weiterleitung extrazellulärer 15 Signale nach Stimulation von Hormonrezeptoren und anderen Rezeptoren, welche nach Rezeptoraktivierung eine Konformationsänderung durchmachen. Dies führt zur Aktivierung von G-Proteinen, welche nachfolgend intrazelluläre Effektoren (z.B. Ionenkanäle, Enzyme) aktivieren oder hemmen können. Heterotrimere G-Proteine sind aus 20 drei Untereinheiten, den α -, β - und γ -Untereinheiten zusammengesetzt. Bislang wurden mehrere unterschiedliche α-Untereinheiten, 5 β-Untereinheiten und ca. 12 y-Untereinheiten mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden nachgewiesen (Birnbaumer, L. and Birnbaumer, M. Signal transduction by G proteins: 25 1994 edition. J. Recept. Res. 15:213-252, 1995; Offermanns, S. and Schultz, G. Complex information processing by the transmembrane signaling system involving G proteins. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 350:329-338, 1994; Nürnberg, B., Gudermann, T., and Schultz, G. Receptors and G proteins as primary components of 30 transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. J.Mol.Med. 73:123-132, 1995; Neer, E.J. Heterotri-

meric G proteins: Organizers of Transmembrane Signals. Cell 80:249-257, 1995; Rens-Domiano, S. and Hamm, H.E. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. FASEB J. 35 9:1059-1066, 1995).

Die rezeptorvermittelte Aktivierung bestimmter -Untereinheiten

Die rezeptorvermittelte Aktivierung bestimmter -Untereinheiten kann durch Vorbehandlung mit Pertussistoxin (PTX) gehemmt werden. Dazu gehören insbesondere die α-Isoformen αil, αi2 und αi3, sowie 40 unterschiedliche o -Untereinheiten. Solche G-Proteine werden auch als "PTX-sensitive G-Proteine" bezeichnet.

Es wurde gefunden, daß sich eine Genveränderung im Gen für humanes G-Protein $\beta3$ -Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen eignet. Diese Genveränderung eignet sich insbesondere zur Ermitt-

lung des Risikos , an einer Krankheit, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Er- 5 mittlung eines relativen Erkrankungsrisikos an mit G-Protein- Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten für einen Probanden, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gensequenz für humanes G-Protein β 3-Untereinheit des Probanden mit der Gensequenz SEQ ID NO:1 vergleicht und für den Fall, daß an Position 825 ein Thymin (T) vorliegt, dem Probanden ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.

Die gefundene Genveränderung befindet sich im Gen für humanes GProtein ß3-Untereinheit. Dieses Gen ist von Levine et al. (Proc.
Natl. Acad. Sci USA, Vol 87, Seite 2329-2333, (1990) beschrieben
15 worden. Der codierende Bereich hat an Position 275 ein Ser-Codon
(TCC), während Probanden mit erhöhtem Risiko für eine Erkrankung,
die mit G-Protein-Pehlsteuerung assoziiert ist, an dieser Position
das ebenfalls für Ser codierende Codon TCT besitzen. Die Genveränderung ist eine Basensubstitution an Position 825, bei der ein
20 Cytosin (C) durch Thymin (T) ersetzt ist. Auf Aminosäureebene ist
dieser Basenaustausch jedoch "stumm", d.h. er führt nicht zum
Einbau einer anderen Aminosäure an dieser Position. Die bei Probanden mit erhöhtem Erkrankungsrisiko gefundene Sequenz ist in
SEQ ID NO:1 im Sequenzprotokoll dargestellt.

Die gefundene Genveränderung tritt in der Regel in heterozygoter Form auf.

Unter Krankheiten, die mit einer G-Protein Fehlsteuerung asso-30 ziiert sind, sind solche Erkrankungen zu verstehen, bei denen das G-Protein in der Signaltransduktion involviert ist und seine Funktion nicht in physiologischer Weise erfüllt.

Die Fehlsteuerung kann eine Reihe von Ursachen haben, beispiels-35 weise eine Veränderung im Strukturgen oder eine veränderte Genexpression.

Bei den Erkrankungen handelt es sich u.a. um Herz-Kreislauf Erkrankungen, Stoffwechselstörungen und Immunerkrankungen.

Als Herz-Kreislauf Erkrankungen sind zu nennen:

25

40

Hypertonie, Schwangerschaftshypertonie (Gestose, "hypertension in pregnancy"), koronare Herzkrankheit, lokalisierte und/oder gene-45 ralisierte Atherosklerose, Stenosen der Blutgefäße, Restenose nach revaskularisierenden Gefäßeingriffen (z.B. PTCA mit und ohne Stentimplantation), Apoplexneigung. Thromboseneigung und gesteigerte Thrombozytenaggregation.

Als Stoffwechselstörungen sind zu nennen:

Metabolisches Syndrom, Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, Typ II-Diabetes mellitus, diabetische Komplikationen (z.B. Nephropathie, Neuropathie, Retinopathie, etc.) Fettstoffwechselstörungen, gestörte zentrale Chemorezeption (CO2-Toleranz, Azidosetoleranz, plötzlicher Kindstod (SIDS)).

Als Immunerkrankungen sind zu nennen:

Gestörte Stärke der körpereigenen Immunantwort (Bildung von Immunglobulinen, Aggressivität von T-Zellen und NK-Zellen), gestörte generelle Proliferationsneigung inkl. Wundheilungsvermögen, Neigung zur Tumorentstehung und Proliferation inkl. Metastasierungspotential maligne transformierter Zellen, Dauer der Latenzzeit nach HIV-Infektion bis zum klinischen Ausbruch der Erkrankung, Kaposi-Sarkom, Neigung zu Leberzhirrose, Transplantatoleranz und Transplantatabstoßung.

Die erfindungsgemäße Verwendung der Genmutation eignet sich besonders zur Ermittlung des Erkrankungsrisikos an Hypertonie.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung von transgenen Tieren, die die oben beschriebene Genmutation tragen. Solche transgenen Tiere sind vor allem als Tiermodelle für die Untersuchung und Therapie der oben beschriebenen Krankheiten von großer Bedeutung. Die Verfahren zur Erzeugung transgener Tiere sind dem Fachmann allgemein bekannt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Ermittlung des relativen Erkrankungsrisikos wird einem Probanden Körpermaterial entnommen, 35 das die genetische Information des Probanden enthält. Dies wird in der Regel durch Blutentnahme und Isolierung der Nukleinsäure hieraus erreicht.

Aus der isolierten Nukleinsäure des Probanden wird die Genstruk- 40 tur für das G-Protein $\beta 3$ -Untereinheit ermittelt und mit der in SEQ ID NO:1 angegebenen Sequenz verglichen.

Die Ermittlung der Genstruktur kann durch Sequenzierung der Nukleinsäure erfolgen. Dies kann entweder direkt aus der 45 genomischen DNA oder nach Amplifizierung der Nukleinsäure beispielsweise mittels PCR-Technik erfolgen. Die Genstruktur kann auf genomischer Ebene oder auch auf mRNA oder cDNA Ebene erfolgen.

Bevorzugt ist die Ermittlung durch Sequenzierung nach PCR-Ampli-5 fikation der cDNA. Die für die PCR-Reaktion geeigneten Primer lassen sich für den Fachmann leich aus den in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenzen ableiten. Man verfährt dabei vorteilhafterweise so, daß jeweils ein Strang und Gegenstrang bindender Primer vor und nach der relevanten Basenposition 825 gewählt wird.

10

Der Genvergleich kann jedoch auch mit anderen Methoden, beispielsweise durch selektive Hybridisierung oder durch entsprechende Kartierung mit Restriktionsenzymen durchgeführt werden. Der Basenaustausch C→T an der oben beschriebenen Position 15 825 führt zum Verlust einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym Dsa I, was ebenfalls dem Nachweis dieses genetischen Polymorphismus dient.

Wenn der Proband an der Position 825 ein Thymin (T) trägt, ist 20 ihm ein höheres Erkrankungsrisiko zuzuordnen als einem Pobanden mit einem Cytosin (C) an dieser Position.

Die Erfindung ist in den folgenden Beispielen weiter veranschaulicht.

25

Beispiel 1

Nachweis der Genveränderung bei Hypertonikern durch Sequenzierung

30 In Voruntersuchungen konnte eine gesteigerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine bei Patienten mit essentieller Hypertonie nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelang in immortalisierten Zellen solcher Patienten, die als phänotypischen Marker eine gesteigerte Aktivität des Na/H- Austauschers aufweisen. Die gesteigerte Aktivierbarkeit PTX-sensitiver G-Proteine hat wichtige Konsequenzen für die Zellfunktion. Dazu gehören eine gesteigerte Bildung intrazellulärer "second messenger" - Moleküle (z.B. Inositol-1,4,5-trisphosphat), eine gesteigerte Freisetzung intrazellulärer Ca²⁺-Ionen, eine vermehrte Bildung von Immunglobulinen und ein beschleunigtes Zellwachstum. Da diese Veränderungen in immortalisierten Zellen und nach langer Zellkulturdauer nachzuweisen sind, kann man davon ausgehen, daß diese Veränderung genetisch fixiert ist (Rosskopf, D., Frömter, E., and Siffert, W. Hy-

pertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immorta-45 lized lymphoblasts from essential hypertensive patients-a cell culture model for human hypertension. *J.Clin.Invest*. 92:2553-2559, 1993; Rosskopf, D., Hartung, K., Hense, J., and siffert, W. Enhanced immunoglobulin formation of immortalized B cells from hypertensive patients. Hypertension 26:432-435, 1995; Rosskopf, D., Schröder, K.-J., and Siffert, W. Role of sodium-hydrogen exchange in the proliferation of immortalised lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects. Cardiovasc.Res. 29:254-259, 1995; Siffert, W., Rosskopf, D., Moritz, A., Wieland, T., Kaldenberg-Stasch, S., Kettler, N., Hartung, K., Beckmann, S., and Jakobs, K.H. Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. J.Clin.Invest. 96:759-766, 1995).

Aus immortalisierten Zellinien von Hypertonikern wurde nach Standardverfahren RNS präpariert und mittels der reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Mittels Polymerase-Kettenreaktion 15 (PCR) wurde die für die G-Proteinuntereinheit G3 kodierende cDNS amplifiziert und sequenziert. Für die PCR-Reaktion wurden die folgenden Oligonukleotid-Primer eingesetzt:

5'-TGG GGG AGA TGG AGC AAC TG und 20 5'-CTG CTG AGT GTG TTC ACT GCC.

Abbildung dargestellt ist.

Im Vergleich zu der von Levine et al. publizierten Sequenz (Levine, M.A., Smallwood, P.M., Moen, P.T., Jr., Helman, L.J., and Ahn, T.G. Molecular cloning of β3 subunit, a third form of the G protein β-subunit polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2329-2333, 1990) wurde in der cDNS aus Hypertonikerzellen die folgende Abweichung gefunden: Nukleotid 825 Cytosin (C) im Bereich der kodierenden Sequenz wird durch ein Thymin (T) ersetzt (Nukleotid 1 entspricht der Base A des Startcodons ATG).
30 Dieser Basenaustausch führt zu einem stummen Polymorphismus, d.h. die durch das entsprechende Basentriplett kodierte Aminosäure (Serin) wird gegenüber der Originalsequenz nicht verändert. Die gefundene DNA-Sequenz ist in SEQ ID NO:1 beschrieben.

35 Beispiel 2

Nachweis der Genveränderung bei Hypertonikern durch Restriktionsenzym-Analyse

40 In der Abbildung ist ein Genvergleich von Normotonikern und Hypertonikern durch Restriktionsenzymanalyse dargestellt. Hier wurde die mittels PCR amplifizierte, für G3 kodierende cDNS aus Zellen von Normotonikern (NT) und Hypertonikern (HT) einer Restriktionsenzymanalyse mit dem Enzym Dsa I unterzogen. Die Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, was in der

WO 97/43442 PCT/EP97/02250

Man erkennt in der Abbildung deutlich die vollständige Restriktion der G3 cDNS aus Normotonikerzellen nach Verdau mit Dsa I. Die cDNS aus Hypertonikerzellen wird nur teilweise durch Dsa I geschnitten. Neben den zu erwartenden Schnittprodukten ergibt sich zudem ungeschnittenes PCR-Produkt. Links und rechts sind Referenzfragmente (Marker) zum Größenvergleich aufgetragen. Vier von fünf der hier dargestellten DNA-Sequenzen von Hypertonikern zeigen den oben beschriebenen Basenaustausch und sind für diese Veränderung heterozygot.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) I	ALGEN	ŒIN	E INI	FORM	ATIO	N:										
	(i)	ANMI	ELDE	R:												
		(A)	NAI	Æ: 1	BASF	Akt:	ienge	esel:	lsch	aft						
					E: Ca											
		•			ıdwiç											
					Bunde			ik D	euts	chla	nd					
					ITZAI											
					ON: (
					K: 0											
		-			176											
	1221	•			L: V			7117	Dia	ന്നവട	+1k ·	ທດກ ໄ	Kran	khoi	ten	
	(11)				Gena:			ZUI	DIG	ynos	LIX	VO11 .	KI GII	viie T	CEII	
t.	111)	ANZ	AHL !	DER	SEQU	enze.	N: 2									
	/ \	COM	क्राक्ट	ם.ז.ם	SBAR	P PA	DW.									
	(14)				RÄGE!			. Ai	ck							
										_						
					ER:											
					BSSY						۸ ۱۷	:	4	1 25	(2D) \	
								кет	ease	₩Т.	U, V	ersi	On #	1.25	(EPA)	1
(2)					EQ I											
	(i)	_			RAKT											
		-	-		151		_	aare								
		-	•		ukle											
		-	•		FORM											
		-	•		GIE:											
					ekül		DNS	zu m	RNS							
•	•				H: N											
(NEIN											
	(vi)				E HE											
					SWUS	: Ho	mo s	apie	ns							
	(ix)		KMAL		_											
		_	•		CHLÜ		: CI	S								
					11											
					HREI											
					CAA											48
Met	Gly	Glu	Met		Gln	Leu	Arg	Gln	Glu	Ala	Glu	Gln	Leu		Lys	
1				5					10					15		
					AGG											96
Gln	Ile	Ala	Asp	Ala	Arg	Lys	Ala	Cys	Ala	Asp	Val	Thr	Leu	Ala	Glu	
			20					25					30			
					GAG											144
Leu	Val	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Val	Gly	Arg	Val	Gln	Met	Arg	Thr	Arg	
		35					40					45				
CGG	ACG	TTA	AGG	GGA	CAC	CTG	GCC	AAG	ATT	TAC	GCC	ATG	CAC	TGG	GCC	192
Arg	Thr	Leu	Arg	Gly	His	Leu	Ala	Lys	Ile	Tyr	Ala	Met	His	Trp	Ala	
	50					55					60					
ACT	GAT	TCT	AAG	CTG	CTG	GTA	AGT	GCC	TCG	CAA	GAT	GGG	AAG	CTG	ATC	240
					Leu											
65	•		-		70					75	-				80	
	TGG	GAC	AGC	TAC	ACC	ACC	AAC	AAG	GTG	CAC	GCC	ATC	CCA	CTG	CGC	288
					Thr											
	- 4-		- •	85				-	90					95	-	
TCC	TCC	TGG	GTC		ACC	TGT	GCC	TAT	GCC	CCA	TCA	GGG	AAC		GTG	336
					Thr											

WO 97/43	442					_								,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	-
						8									
		100					105					110		_	204
GCA TGT G	ece i	ccc	CTG	GAC	AAC	ATG	TGT	TCC	ATC	TAC	AAC	CTC	AAA	TCC	384
Ala Cys	31v (Glv	Leu	Asp	Asn	Met	Cys	Ser	Ile	Tyr	Asn	Leu	Lys	Ser	
1	115					120					125				
COM CAC C	-00	ጥፈል	GTC	AAG	GTC	AGC	CGG	GAG	CTT	TCT	GCT	CAC	ACA	GGT	432
Arg Glu	30C /	y en	Val	īvs	Val	Ser	Arq	Glu	Leu	Ser	Ala	His	Thr	Gly	
	JLY '	UDII	V 4.4	-1-	135					140					
130 TAT CTC 1	ncc	mcc	ጥርር	CGC	ጥጥር	CTG	GAT	GAC	AAC	AAT	ATT	GTG	ACC	AGC	480
TAT CTC	rcc	760	Lac	Ara	Phe	T.eu	ARD	Asp	Asn	Asn	Ile	Val	Thr	Ser	
	Ser	Cys	Cys	150	1110	200			155					160	
145 TCG GGG (3.00	120 120	ccc	ጥጥር	ጥርር	GAC		GAG	ACT	GGG	CAG	CAG	528
TCG GGG G	GAC	ACC	ALG	761	315	Tou	ULT.	yan	Tle	Glu	Thr	Glv	Gln	Gln	
Ser Gly	Asp	Thr		Cys	Ald	Dea	ΙΙĐ	170	110			,	175		
			165		~~	3.00	oom	TIO	mac	እጥር	ACC	CTG		GTG	576
AAG ACT	GTA	TTT	GTG	GGA	CAC	ACG	GGT	GAC	760	Mot	Sor	T.OII	Mla	Val	
Lys Thr	Val		Val	GIA	HIS	Thr	GIA	ASP	Cys	Mer	DEI	190	*****	741	
		180					185		000	mcm	CNT		አርጥ	ccc	624
TCT CCT	GAC	TTC	AAT	CTC	TTC	ATT	TCG	فافافا	GCC	161	GAI	330	DO.	λla	021
Ser Pro	Asp	Phe	Asn	Leu	Phe	Ile	Ser	Gly	ATA	Cys	ASP	AId	Ser	Ald	
	195					200					205		3.CM	CCC	672
AAG CTC	TGG	GAT	GTG	CGA	GAG	GGG	ACC	TGC	CGT	CAG	ACI	TIC	ACT	GGC	072
Lys Leu	Trp	Asp	Val	Arg	Glu	Gly	Thr	Cys	Arg	Gln	Thi	Pne	Thr	GIA	
210					215					24U	ļ.				720
030 C3C	TCG	GAC	ATC	AAC	GCC	ATC	TGT	TTC	TTC	ccc	: AA?	GGA	GAG	GCC	720
His Glu	Ser	Asp	Ile	Asn	Ala	Ile	Cys	Phe	Phe	Pro	ASI	ı Gly	Glu	MIG	
225				230					235	•				240	7.60
3 mg mgc	ACG	GGC	TCG	GAT	GAC	GCT	TCC	TGC	CGC	TTC	TT	r gac	CTG	CGG	768
Ile Cys	Thr	Glv	Ser	Asp	Asy	Ala	. Ser	Cys	: Arg	Lev	ı Pho	e Asi) Dec	LAIG	
			245					250	,				<i>43</i> .	,	
GCA GAC	CAG	GAG	CTC	ATO	TG	TTC	TC	CAC	GAC	G AG	TA	C ATY	C TG	CGC	816
Ala Asp	Gln	Gli	Let	Ile	Cv	s Phe	e Sei	r His	s Glu	ı Se	c Il	e Ile	е Су	3 Gly	
		260	1				26:	5				2/	J		
ATC ACG	men	CTI	2 600	ייריים י	тс	C CT	C AG	T GG	CGG	CT	A CT	A TT	C GC'	r GGC	864
Ile Thr	201	. Va.	. Δ1:	Pho	s Se	r Le	u Se:	r Gl	y Ar	g Le	u Le	u Ph	e Ala	a Gly	
	275	:				28	0				⊿ 0)			
TAC GAC	CAC	· (1971)	י א	т тс	C AA	ጥ GT	C TG	G GA	C TC	C AT	G AA	G TC	T GA	G CGT	912
TAC GAC Tyr Asp	. GAC	Dh.	o Aei	n Cv	n An	n Va	1 Tr	D As	p Se	r Me	t Ly	s Se	r Gl	u Arg	
					20	5				30	U				
290 GTG GGC		- cm	c mc	ጥ ሮሮ	כים מיזי	C GA	ጥ ልል	C AG	G GT	G AG	C TO	C CI	G GG	A GTC	960
Val Gly	. AT(. CI	u Po	r G0	v Hi	e As	n As	n Ar	σ Va	1 Se	r Cy	s Le	u Gl	y Val	
	110	s ne	u se	31	,		y		31	.5				320	
305 ACA GCI			C 3 M	אר הע	יט פיז	ים פר	יר אר	'A GG	ጥ ጥር	C TG	G G	C AC	C TI	C CTC	1008
ACA GC1	' GA	C GG	G AI	. R	2 V:	1 31	יים. אידי ב	ar Gl	v Se	r Tr	no As	sp Se	r Ph	e Leu	
Thr Ala	AS	D GI			a ve	ii ni		33	יז נח				33	5	
			32	5 C	CACC	יריתכנ	2AC 2	ממממ	CAAC	T GO	AAG	GCAG?	r GA	CACACTC	1064
					GAG	3C 1 G(ang r	ZIMO(,0,111						
Lys Ile	e Tr			•											
		34	10			ama 1	יישרי ו	እሮርሞር	بماطاطات	ולה לעו	יכידא	TATT	c cg	GTGCCAT	1124
AGCAGC	cccc	: TG(CCG	ACCC	CAT	CICH.	TIC A	GCGG.) にしかり) エ	TC C	27 Cu	GTCC	C July	GGTGCCAT TGGGAGGC	1184
TCCCAC	TAAC	CT	rrcr(CCTT	TGA	نانانانا 	AGT (CCC2*		רעט ער דרם קט	הר שעה הריד	GGCC.	ጥ ጥር	rgggaggc cctccca	
.AGCATC	AGGC	AC	ACAG	GGGC	AAA	GAAC	TGC '	CCCA.	ロンフレ	CLE C	CCCC	ጥርርር	C 70	ACCICCEA COTTTCC	1304
	mas a			ጥሮሮሮ	Δηγ	ልጥሮል	CCA.	AGGA	CAAC	L'I' G	しししし	TUCU	CAG	CCCIIIGC	4501
				እሮሞሮ	ጥር እ	CCCC	CCA	GGCC	CTAG	GA T	TOCI		CAG	WGCCWCIV	1301
				aama	CMX	ጥአርር	מככ	Charach	ccc	1G T	GACI	WIR	\sim 10	TOGCTCC	7303
CTAGGG	TCC!	r GG	CCCT	CTTC	TTA	TTCA	TGC	TTTC	TCCT	TT T	TCTA	CCTT	TTT	TTCTCTCC	1517
TAAGAC	'ACC	r GC	AATA	AAGT	GT?	IGCAC	CCT	GGT							121/
(2) IN	TFOR	MATI	ON Z	U SE	Q II	NO:	2:								
(2) 22			_												

PCT/EP97/02250

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 341 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2: Met Gly Glu Met Glu Gln Leu Arg Gln Glu Ala Glu Gln Leu Lys Lys 10

5 Gln Ile Ala Asp Ala Arg Lys Ala Cys Ala Asp Val Thr Leu Ala Glu 25

Leu Val Ser Gly Leu Glu Val Val Gly Arg Val Gln Met Arg Thr Arg 40

Arg Thr Leu Arg Gly His Leu Ala Lys Ile Tyr Ala Met His Trp Ala 60 55

Thr Asp Ser Lys Leu Leu Val Ser Ala Ser Gln Asp Gly Lys Leu Ile 75 70

Val Trp Asp Ser Tyr Thr Thr Asn Lys Val His Ala Ile Pro Leu Arg 90 85

Ser Ser Trp Val Met Thr Cys Ala Tyr Ala Pro Ser Gly Asn Phe Val 105 100

Ala Cys Gly Gly Leu Asp Asn Met Cys Ser Ile Tyr Asn Leu Lys Ser 125 120

Arg Glu Gly Asn Val Lys Val Ser Arg Glu Leu Ser Ala His Thr Gly 135

Tyr Leu Ser Cys Cys Arg Phe Leu Asp Asp Asn Asn Ile Val Thr Ser 155 150

Ser Gly Asp Thr Thr Cys Ala Leu Trp Asp Ile Glu Thr Gly Gln Gln 170 165

Lys Thr Val Phe Val Gly His Thr Gly Asp Cys Met Ser Leu Ala Val 185

Ser Pro Asp Phe Asn Leu Phe Ile Ser Gly Ala Cys Asp Ala Ser Ala 205 200

Lys Leu Trp Asp Val Arg Glu Gly Thr Cys Arg Gln Thr Phe Thr Gly 220 215

His Glu Ser Asp Ile Asn Ala Ile Cys Phe Phe Pro Asn Gly Glu Ala 235 230

Ile Cys Thr Gly Ser Asp Asp Ala Ser Cys Arg Leu Phe Asp Leu Arg 250 245

Ala Asp Gln Glu Leu Ile Cys Phe Ser His Glu Ser Ile Ile Cys Gly 265

Ile Thr Ser Val Ala Phe Ser Leu Ser Gly Arg Leu Leu Phe Ala Gly 280

Tyr Asp Asp Phe Asn Cys Asn Val Trp Asp Ser Met Lys Ser Glu Arg 300 295

Val Gly Ile Leu Ser Gly His Asp Asn Arg Val Ser Cys Leu Gly Val 315 310

Thr Ala Asp Gly Met Ala Val Ala Thr Gly Ser Trp Asp Ser Phe Leu 335 330 325

Lys Ile Trp Asn * 340

PCT/EP97/02250 WO 97/43442

10

Patentansprüche

10

45

Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein 1. β 3-Untereinheit zur Diagnostik von Erkrankungen. 5

- Verwendung einer Genveränderung im Gen für humanes G-Protein $\beta3$ -Untereinheit zur Ermittlung des Risikos , an einer Krankheit, die mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziiert ist, zu erkranken.
- Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Genveränderung im Codon für die Aminosäure 275 in SEQ ID NO:1 liegt.

15 Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß an 4. Position 825 in SEQ ID NO:1 eine Substitution von Cytosin durch Thymin vorliegt.

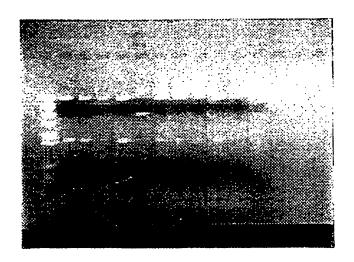
- Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die 20 5. Krankheit eine Herz-Kreislauf-Erkrankung, eine Stoffwechselstörung oder eine Immunerkrankung ist.
- Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die 6. Krankheit Hypertonie ist. 25
- Verfahren zur Ermittlung eines relativen Erkrankungsrisikos 7. an mit G-Protein-Fehlsteuerung assoziierten Krankheiten für einen Probanden, dadurch gekennzeichnet, daß man die Gensequenz für humanes G-Protein $\beta 3$ -Untereinheit des Probanden mit 30 der Gensequenz SEQ ID NO:1 vergleicht und für den Fall, daß an Position 825 ein Thymin (T) vorliegt, dem Probanden ein erhöhtes Erkrankungsrisiko zuordnet.
- Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der 35 8. Genvergleich durch Sequenzierung vorgenommen wird.
- Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß vor 9. der Sequenzierung ein Genabschnitt, der Position 825 beinhaltet, amplifiziert wird. 40
 - 10. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß daß der Genvergleich durch Hybridisierung durchgeführt wird.

WO 97/43442 PCT/EP97/02250

11. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Genvergleich durch Spaltung mittels Restriktionsenzymen durchgeführt wird.

5 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Restriktionsenzym Dsa I verwendet wird.

AT HT HT HT HT HT HT HT



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No PCT/EP 97/02250

A CLASSIF	TCATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68		
A constitus to	International Patent Classification (IPC) or to both national classification	tion and IPC	
B FIELDS	SEARCHED		
Minimum do	cumentation searched (classification system followed by classification ${\tt C12Q}$	symbols)	
Documentati	on searched other than minimum documentation to the extent that suc	h documents are included in the fields se	ercheo
Electronic da	ata base consulted during the international search (name of data base	and, where practical, search terms used)	
C. DOCUM	IENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the rele	want passages	Relevant to claim No.
A	COTTON R G H: "CURRENT METHODS OF MUTATION DETECTION" MUTATION RESEARCH, vol. 285, 1 January 1993, pages 125-144, XP000443992 see the whole document		1-12
A .	LEVINE ET AL.: "MOLECULAR CLONING BETA3 SUBUNIT, A THIRD FORM OF TH PROTEIN BETA-SUBUNIT POLYPEPTIDE" PROC. NATL. ACAD. SCI., vol. 87, 1990, pages 2329-2333, XP002041163 cited in the application see the whole document	G OF E G	1-12
		Patent family members are listed	In APPEX
X Fu	rther documents are listed in the continuation of box C.	Takk lakiny likihodi at ki	
"A" documents on silver of the country of the count	ment defining the general state of the art which is not idered to be of particular relevance or document but published on or after the international g date ment which may throw doubts on priority claim(s) or this cited to establish the publication date of another ion or other special reason (as specified) ment referring to an oral disclosure, use, exhibition or a means	"T" later document published after the in or priority date and not in conflict we cited to understand the principle or invention "X" document of particular relevance; the cannot be considered novel or cannot involve an inventive step when the cannot be considered to involve an indocument of particular relevance; the cannot be considered to involve an indocument is combined with one or ments, such combination being obvi in the art.	with the application that theory underlying the e claimed invention to be considered to focument is taken alone e claimed invention inventive step when the more other such docu-
later	ment published prior to the international filing date but than the priority date claimed	'&' document member of the same pater	
İ	19 September 1997	Date of mailing of the international:	search report
	d mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Ripswik Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hagenmaier, S	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No PCT/EP 97/02250

alegory "	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	."	levant to claim No.
	SIFFERT ET AL.: "ENHANCED G PROTEIN ACTIVATION IN IMMORTALIZED LYMPHOBLASTS FROM PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION" J. CLIN. INVEST., vol. 96, 1995, pages 759-766, XP002041164 see the whole document		1-12
	·		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internati es Aktenzeichen
PCT/EP 97/02250

A. KLASSIF IPK 6	izierung des anmeldungsgegenstandes C12Q1/68		
Nach der Inte	rnationalen Patentidassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassi	fikation und der IPK	
B RECHER	CHIERTE GEBIETE		
Recherchierte IPK 6	r Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole C12Q	_	
Recherchierte	aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, sowe	it diese unter die rocherchierten Gebiete	fallen
Während der	internationalen Recherche konsultuerte elektronische Datenbank (Nam	ne der Datenbank und evil, verwendete	Suchbegriffe)
CAISWE	SENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe	der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	COTTON R G H: "CURRENT METHODS OF MUTATION DETECTION" MUTATION RESEARCH, Bd. 285, 1.Januar 1993, Seiten 125-144, XP000443992 siehe das ganze Dokument		1-12
A	LEVINE ET AL.: "MOLECULAR CLONING BETA3 SUBUNIT, A THIRD FORM OF THE PROTEIN BETA-SUBUNIT POLYPEPTIDE" PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 87, 1990, Seiten 2329-2333, XP002041163 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	6 OF E G	1-12
	itere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu	Siehe Anhang Patentfamilie	
* Besonder 'A' Veröl aber 'E' ältere Anm 'L' Veröl schei ande soll (ausg 'O' Verö eine 'P' Veröl dem	e Kasegorien von angegebenen Veröffentlichungen: fentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist i Dolument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen eldedatum veröffentlicht worden ist fentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsamspruch zweifelhaft er- nen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer ren im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie eführt) ffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung. Bennstzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht	1" Spätere Veröffentlichung, die nach de oder dem Prioritätsdatum veröffentlichung nicht kollidiert, sondern Erfindung zugrundeliegenden Prinzig Theorie angegeben ist X' Veröffentlichung von besonderer Bet kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung von besonderer Bet kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung sonderen Bet kann nicht als auf erfinderischer Tät werden, werm die Veröffentlichung i Veröffentlichung nicht eine Veröffentlichung die einen Fachmas veröffentlichung, die Mitglied derse Absendedatum des internationalen in 10, 11, 10, 97	one worden ist und interest worden ist und interest was a der one oder der ihr zugrundeliegende leutung; die beanspruchte Erfind tlichung nicht als neu oder auf trachtet werden leutung; die beanspruchte Erfindigkeit beruhend betrachtet mit einer oder mehreren anderen in Verbindung gebracht wird und naheltegend ist liben Patentfamilie ist
1	19.September 1997 3 Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Devollmächtigter Bediensteter	
Name un	Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tcl. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Hagenmaier, S	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 97/02250

		PCT/EP 9	7702230
C.(Fortsetzu	ng) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN	- 4 T-ile	Betr. Anspruch Nr.
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht komme	ngen Leite	Dea, Allaparen
A	SIFFERT ET AL.: "ENHANCED G PROTEIN ACTIVATION IN IMMORTALIZED LYMPHOBLASTS FROM PATIENTS WITH ESSENTIAL HYPERTENSION" J. CLIN. INVEST., Bd. 96, 1995, Seiten 759-766, XP002041164 siehe das ganze Dokument		1-12



- (11) Veröffentlichungsnummer:
- (11) Publication number:

EP 1 112 362 A0

(11) Numéro de publication:

Internationale Anmeldung veröffentlicht durch die Weltorganisation für geistiges Eigentum unter der Nummer:

WO 00/15785 (art. 158 des EPÜ).

International application published by the World Intellectual Property Organisation under number:

WO 00/15785 (art. 158 of the EPC).

Demande internationale publiée par l'Organisation Mondiale de la Propriété sous le numéro:

WO 00/15785 (art. 158 de la CBE).



- (11) Veröffentlichungsnummer:
- (11) Publication number:

EP 1 112 362 A0

(11) Numéro de publication:

Internationale Anmeldung veröffentlicht durch die Weltorganisation für geistiges Eigentum unter der Nummer:

WO 00/15785 (art. 158 des EPÜ).

International application published by the World Intellectual Property Organisation under number:

WO 00/15785 (art. 158 of the EPC).

Demande internationale publiée par l'Organisation Mondiale de la Propriété sous le numéro:

WO 00/15785 (art. 158 de la CBE).